

02

PCT/DE 00/01863

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

10/009926

DE 00/01863



REC'D 08 AUG 2000

IPC F01

EJU

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

[Signature]

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Aktenzeichen:

199 25 862.7

Anmeldetag:

07. Juni 1999

Anmelder/Inhaber:

DIIVIR GmbH,
Altomünster/DE

Bezeichnung:

Verfahren zur Synthese von DNA-Frag-
menten

IPC:

C 07 H 21/00

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.**

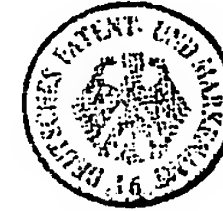
München, den 13. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

[Signature]

Hiebinger

Neue deutsche Patentanmeldung
Titel: Verfahren zur Synthese von DNA-Fragmenten
Anmelder: DIAVIR GmbH, Steinbergstr. 30, D-85250 Altomünster
Unser Zeichen: DV-001

7.6.99



5

Verfahren zur Synthese von DNA-Fragmenten

Nach dem derzeitigen Stand der Technik müssen für eine Synthese einer etwa 2,5 kb großen

10 Nukleinsäuresequenz zunächst etwa 50 verschiedene, teilweise überlappende ca. 80mer
Oligonukleotide synthetisiert und aufgereinigt werden. Diese werden dann paarweise oder in
Subsets hybridisiert und mittels einer Klenow-Polymerase-Reaktion aufgefüllt oder mit den
außen liegenden Oligonukleotiden als Primer in einer Polymerasekettenreaktion (PCR)
hergestellt und (meist über einzubauende Restriktionsstellen) unidirektional miteinander
15 verknüpft. Im Idealfall dauert diese Prozedur eine Woche, im Regelfall jedoch eher 6-12
Wochen, mitunter sogar 6 Monate.

Eines der Hauptprobleme besteht darin, daß längere Oligonukleotide aus Gründen der
Kopplungseffizienz, die selbst bei gut verlaufenden Synthesen nur 99% pro Schritt erreicht,
20 immer einen unvermeidbaren Anteil an Abbruchprodukten aufweisen. Darüber hinaus kommt es
auch zu Deletionen, die aus nicht 100%igem Capping resultieren. Selbst bei sehr guten
Synthesen liegt dieser Anteil bei ca. 0,25% pro Kopplungsschritt. Die so entstandenen
unvollständigen Oligonukleotidprodukte können selbst mit großem Aufwand von längeren
Oligonukleotiden nicht vollständig abgetrennt werden.

Bei einer durchschnittlichen Kopplungseffizienz von 98% erhält man beispielsweise bei einem
80mer eine Ausbeute des gewünschten Produkts mit voller Länge von lediglich 19.86%. Mit den
heutzutage verfügbaren Aufreinigungsprozeduren kann das gewünschte Endprodukt in einer
Reinheit von bestenfalls 95% dargestellt werden. Auch wenn dann nur noch ein kleiner Teil der
30 endgereinigten Oligonukleotide fehlerhaft ist, steigt dennoch die Wahrscheinlichkeit einer fehler-
haften Endsequenz mit der Zahl der eingesetzten Oligonukleotide dramatisch an. Eine Sequenz,
die sich aus 50 der beschriebenen Oligonukleotide zusammensetzt, ist demnach nur in 7,7% aller
Fälle korrekt und muß deshalb in aller Regel nachgearbeitet werden. Ein relativ seltener Einbau
falscher Basen aufgrund von Fehlkopplungen während der Synthese ist dabei nicht berück-
35 sichtigt.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht somit in der Bereitstellung eines Verfahrens zur effizienten Synthese doppelsträngiger DNA-Fragmente beliebiger Sequenz und Länge. Eine weitere Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Kits zur Herstellung doppelsträngiger DNA-Fragmente.

Die Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, umfassend die Schritte

- a) Kopplung eines Oligonukleotids an eine feste Matrix,
- 10 b) Zugabe eines weiteren Oligonukleotids,
- c) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt a) und b),
- d) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem außerhalb der Erkennungssequenz spaltenden Restriktionsenzym, wobei die Spaltung in der Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotids aus Schritt b) stattfindet,
- 15 e) Abtrennen des Reaktionsgemisches vom in Schritt d) erhaltenen verlängerten Oligonukleotid aus Schritt a),
- f) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte b) bis e).

Bevorzugt ist ein Verfahren, wobei nach Schritt c) als Schritt c) eine Exonuklease- und/oder Phosphatase-Reaktion durchgeführt wird. Ferner bevorzugt ist ein Verfahren, wobei das Reaktionsgemisch des Schrittes c) nach der Reaktion entfernt wird. Ferner bevorzugt ist ein Verfahren, wobei in der letzten Wiederholung der Schritte b) bis e) der Schritt d) nicht durchgeführt wird. Ferner bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die erhaltene Nukleinsäuresequenz durch Restriktionsspaltung vom Oligonukleotid aus Schritt a) abgetrennt wird. Ferner bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Kopplung des Oligonukleotids aus Schritt a) an die feste Matrix über eine Modifikation erfolgt. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Modifikation ein Biotinrest, ein Digoxigeninrest, ein Fluoresceinisothiocyanat (FITC), eine Aminoverbindung oder ein Succinylester ist. Ferner bevorzugt ist ein Verfahren, wobei das Oligonukleotid aus Schritt a) und/oder b) über einen Loop verfügt. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei das Oligonukleotid aus Schritt a) mit dem Loop an die feste Matrix gekoppelt ist. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die feste Matrix ein Kügelchen (bead), vorzugsweise aus Glas oder Polystyrol, die Vertiefung einer Mikrotiterplatte (well) oder ein Reaktionsröhrchen ist. Insbesondere bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die feste Matrix einen magnetisierten

Streptavidinrest, einen anti-Digoxigenin-Antikörper oder einen anti-FITC-Antikörper umfaßt. Ferner bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Oligonukleotide aus Schritt a) und b) an ihren zu ligierenden Enden über zueinander komplementäre Einzelstrangüberhänge verfügen. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Einzelstrangüberhänge 2, 3, 4 oder 5 Nukleotide lang sind. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Nukleinsäuresequenz eine cDNA-Sequenz, eine Designersequenz, eine synthetische Sequenz oder eine modifizierte Sequenz ist. Besonders bevorzugt ist eine nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Nukleinsäure.

~~Insbesondere bevorzugt ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure als DNA-~~
Vakzine, zur Analyse von Proteindomänen, als Matrize für Designerproteine, zur schnellen Proteinsynthese, zur Herstellung von Ribozymen oder Aptameren, als Sonde zum Nachweis pathogener Mikroorganismen, als Sonde zum Nachweis der Expression von Genen, zum Nachweis allelspezifischer Mutationen, zum Nachweis von Protein/Protein-Bindung, Protein/Peptid-Bindung und/oder der Bindung niedermolekularer Stoffe an Proteine.

Die Aufgabe wird ferner gelöst durch die Bereitstellung eines Kit zur Herstellung einer Nukleinsäuresequenz nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, umfassend

- a) ein an eine feste Matrix koppelbares Oligonukleotid,
- b) mindestens zwei weitere Oligonukleotide.

Bevorzugt ist ein Kit, ferner umfassend eine Matrix und/oder eine Ligase und/oder ein oder mehrere Restriktionsenzym(e) und/oder eine Exonuklease und/oder eine Phosphatase.

Die Erfindung wird weiter durch die folgenden Figuren erläutert.

Figur 1 zeigt eine schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. T, G, C, A und N bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T Thymin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin und N eine beliebige der vier Nukleinsäurebasen bedeutet.

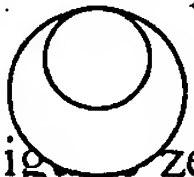
Figur 2 zeigt schematisch den Aufbau eines EasyPro™ Transkriptions/Translationssystems von PCR-Fragmenten. Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. 5'-UTR bedeutet 5'-untranslatierter Bereich. ATG bedeutet Startcodon. 6 x His bedeutet eine sechsmalige Aneinanderreihung von Histidincodons. Single T overhang bedeutet einen Überhang von einem Thyminrest.

Figur 3 zeigt eine schematische Darstellung eines Minireaktors für die Proteinsynthese.

Figur 4 zeigt eine schematische Darstellung der Produktion einer Peptidlibrary mit dem QuickPep™-Verfahren. Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. T7 bedeutet T7-Promotor. rbs bedeutet interne Ribosomenbindungsstelle. ATG bedeutet Startcodon. EK bedeutet Enterokinase-Schnittstelle. ~~Peptid-ORF bedeutet den offenen Leserahmen des Peptids. STOP bedeutet das Stopcodon. Poly~~
A bezeichnet den poly-A-Schwanz.

10

Figur 5 zeigt eine schematische Darstellung der Selektion von Ribozymen mit dem RiboSelect™-Verfahren.



15

Figur 6 zeigt eine schematische Darstellung des Nachweises von Pathogenen nach Anreicherung durch PCR (PathoCheck™). Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist.

Figur 7 zeigt eine schematische Darstellung der Identifizierung bekannter Allele durch Ligation markierter Splinker (LIMA™). Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. x bedeutet die Stelle, an der die zu bestimmende Modifikation vorliegt.

Figur 8 zeigt eine schematische Darstellung der Parallelanalyse von mRNA-Arrays (PAMINA™).

25

Figur 9 zeigt die schematische Darstellung eines Anchor-Oligonukleotids. Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. T, G, C, A bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T Thymin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin bedeutet. Esp3I bezeichnet ein Restriktionsenzym.

30

Figur 10 zeigt die schematische Darstellung eines Anchor-Oligonukleotids. Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. T, G, C, A bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T Thymin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin

bedeutet. BpII bezeichnet ein Restriktionsenzym.

Figur 11 zeigt die schematische Darstellung eines Bipartite-Anchor-Oligonukleotids. Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. T, G, C, A bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T Thymidin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin bedeutet.

~~Figur 12 zeigt die schematische Darstellung eines Splinker-Oligonukleotids. T, G, C, A bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T Thymidin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin bedeutet. BsaI und Eco3II bezeichnen Restriktionsenzyme.~~

Figur 13 zeigt die schematische Darstellung eines Bipartite-Splinker-Oligonukleotids. T, G, C, A bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T Thymidin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin bedeutet. BsaI und Eco3II bezeichnen Restriktionsenzyme.

15

Definitionen

Der hier verwendete Begriff "Sloning" (Sequentielle Ligation von Oligonukleotiden auf Sequenz-unabhängige Weise) bezieht sich auf ein Verfahren zur aufeinanderfolgenden Ligation von Oligonukleotiden mit beliebiger Sequenz.

Der hier verwendete Begriff "Anchor" oder "Anchor-Oligonukleotid" bezieht sich auf ein Oligonukleotid, welches über eine Modifikation an eine feste Matrix gekoppelt werden kann. Im Sinne der vorliegenden Erfindung enthält das Oligonukleotid in seinem doppelsträngigen Anteil ferner eine Restriktionsschnittstelle für ein TypII Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet.

Der hier verwendete Begriff "Splinker" oder "Splinker-Oligonukleotid" bezieht sich auf ein Oligonukleotid, welches über keine bzw. eine andersgeartete Modifikation verfügt, so daß es nicht selbst an die Matrix bindet, an welche die Anchor-Oligonukleotide gekoppelt sind.

Der hier verwendete Begriff "Dumbbell" (auf dt.: Glockenklöppel) bezieht sich auf eine DNA-Struktur, die durch einen Doppelstrang charakterisiert ist, der von zwei Loops flankiert wird.

Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, umfassend die Schritte

- a) Kopplung eines Oligonukleotids an eine feste Matrix,
- 5 b) Zugabe eines weiteren Oligonukleotids,
- c) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt a) und b),
- d) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem außerhalb der Erkennungssequenz spaltenden Restriktionsenzym, wobei die Spaltung in der Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotids aus Schritt b) stattfindet,
- 10 e) Abtrennen des Reaktionsgemisches vom in Schritt d) erhaltenen verlängerten Oligonukleotid aus Schritt a),
- f) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte b) bis e).

Eines der beiden in jedem Reaktionsschritt zu verknüpfenden Oligonukleotide (das sog. "Anchor"-Oligonukleotid) ist über eine Modifikation, z.B. eine niedermolekulare chemische Verbindung wie Biotin oder Digoxigenin, an eine feste Matrix koppelbar. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich dabei um magnetische Streptavidin-beschichtete oder anti-Digoxigenin-beschichtete Beads. Das andere Oligonukleotid (das sog. "Splinker"-Oligonukleotid) besitzt auch ein blockiertes Ende, aber keine derartige oder aber eine andersartige Modifikation. Der Punkt auf den es ankommt ist der, daß die Anchor-Oligonukleotide durch die Bindung an eine geeignete Matrix von den Splinker-Oligonukleotiden getrennt werden können. Es können daher beliebige Verbindungen z.B. Biotin, Digoxigenin, 20 Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Aminoverbindungen, Succinylester und andere dem Fachmann geläufige Verbindungen, verwendet werden, sofern sie geeignet sind, direkt oder indirekt z.B. 25 über einen Antikörper eine Bindung an eine feste Phase zu vermitteln.

Anchor-Oligonukleotide können entweder aus einem einzigen zum Teil selbstkomplementären Oligonukleotid bestehen, welches über eine Modifikation vorzugsweise in der Loopsequenz an eine feste Phase koppelbar ist, oder aus zwei einzelsträngigen Oligonukleotiden, welche einen 30 Doppelstrang bilden, vorzugsweise mit einem Einzelstrangüberhang. Da nur einer der beiden Stränge an eine Matrix gekoppelt werden muß, kann der andere wenn nötig durch Alkali oder Hitze denaturiert und abgetrennt werden (etwa um als Template für eine PCR-Reaktion zu dienen). Um sicherzugehen, daß auch bei solchen zweigeteilten Anchor-Oligonukleotiden nur

ein Ende ligierbar ist, werden die nicht für die Ligation benötigten Enden entsprechend modifiziert. Nukleinsäuresequenzen beispielhafter Anchor-Oligonukleotide sind

Anchor A3I

5 5'-GCTTCGAGACGCGTTTTTCGCGTCTCG-3' (SEQ ID NR:1; FIG. 9)

Anchor A2+

5'-AGAATGGTCTTCGAGCTTTTGCTCGAAGACCA-3' (SEQ ID NR:2; FIG. 10)

10 Bipartite Anchor

5'-CGCGGATCCGCGGCGT-3' (SEQ ID NR:3, FIG. 11)

5'-CGAGACGCCGCGGATCCGCG-3' (SEQ ID NR:4, FIG. 11)

Splinker-Oligonukleotide können entweder aus einem einzigen zum Teil selbstkomplementären
15 Oligonukleotid bestehen oder aus zwei einzelsträngigen Oligonukleotiden, welche einen Doppelstrang bilden, vorzugsweise mit einem Einzelstrangüberhang, wobei die jeweils nicht zu ligierenden Enden der beiden Einzelstränge blockiert sein müssen. Die bevorzugte Einzelstrangüberhangsequenz muß zu dem jeweils zu ligierenden Anchor-Oligonukleotid komplementär sein. Nukleinsäuresequenzen beispielhafter Splinker-Oligonukleotide sind

20

Splinker S1H

5'-AAGCTTCTGGAGACCGCTTTTGCGGTCTCCAGAA-3' (SEQ ID NR:5, FIG. 12)

Bipartite Splinker

25 5'-CTCGAAGCGGAGACCGCCAC-3' (SEQ ID NR:6, FIG. 13)

5'-GTGGCGGTCTCCGCTT-3' (SEQ ID NR:7, FIG. 13)

Sowohl Anchor- wie auch Splinker-Oligonukleotide können Überhänge einer definierten Länge
30 enthalten, in einer bevorzugten Ausführungsform zwei bis fünf Nukleotide. Diese Überhänge sind bei den jeweils zu ligierenden Oligonukleotiden komplementär zueinander, am 5' Ende phosphoryliert und können nur in einer Orientierung miteinander ligiert werden. Dabei entsteht ein ligiertes Oligonukleotid mit z.B. einer sogenannten "Dumbbell"-Struktur. Um eine vollständige Ligation aller verfügbaren Anchor Oligonukleotide zu erreichen, können die

anzuligierenden Splinker-Oligonukleotide in 2 bis 10fachem Überschuß zugesetzt werden. Die überschüssigen, nicht-reagierten Splinker werden nach jedem Ligationsschritt mit Puffer gewaschen. Werden z.B. mit magnetisiertem Streptavidin beschichtete Beads verwendet, können die Beads mit den über eine Streptavidin/Biotin-Bindung gebundenen Anchor-Oligonukleotiden zusammen mit den anligierten Splinkern durch den Einsatz eines Magneten im Reaktionsansatz zurückgehalten werden. Alternativ können z.B. direkt mit Streptavidin beschichtete Wells, Glas(beads) oder beliebige andere feste Phasen verwendet werden. Beads werden in der Regel bevorzugt, weil sie eine größere Oberfläche und daher eine höhere Bindungskapazität aufweisen.

10

Um weitere Ligationen durchführen zu können, muß eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease vorhanden sein, die die Nukleinsäuresequenz außerhalb dieser Erkennungssequenz in dem anligierten Splinker-Oligonukleotid schneidet. Beispiele für solche Enzyme sind BpI, Esp3I, Eco31I, SapI etc. Für das erfindungsgemäße Verfahren nützliche Restriktionsenzyme und ihre Erkennungssequenzen und Schnittstellen sind in der Rebase-Datenbank unter <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html> zu finden. An der in den Splinker-Oligonukleotiden enthaltenen Restriktionsschnittstelle werden die Ligationsprodukte so geschnitten, daß ein Teil der Splinkersequenz am Anchor-Oligonukleotid verbleibt. Gleichzeitig wird dadurch ein Sequenzüberhang erzeugt, der für die Ligation eines weiteren Splinker-Oligonukleotids herangezogen werden kann. Der andere abgespaltene Teil des Splinker-Oligonukleotids, das Restriktionsenzym sowie der Restriktionspuffer werden aus dem Reaktionsansatz ausgewaschen, worauf ein weiterer Zyklus beginnt. Der Zyklus kann beliebig oft wiederholt werden, bis die gewünschte Nukleinsäuresequenz erhalten wurde. Um nicht-umgesetzte Anchor-Oligonukleotide von der weiteren Synthese auszuschließen, kann fakultativ nach der Ligation ein Exonuklease- und/oder Phosphatase-Schritt zwischengeschaltet werden, wodurch der Überhang oder zumindest die für die folgende Ligation erforderliche 5'-Phosphatgruppe entfernt wird. Der Anteil an nicht-umgesetzten Anchor-Oligonukleotiden ist bei einem eingesetzten Überschuß an Splinker-Oligonukleotiden nur gering. Eine Weiterreaktion sollte zudem nur dann möglich sein, wenn dieselbe Sequenz ein weiteres Mal anligiert wird, weswegen die Gefahr einer Kontamination mit nicht oder nur teilweise umgesetzten Anchor-Oligonukleotiden als relativ gering anzusehen ist.

Die so nach mehreren Ligations- und Restriktionszyklen aufligierte Nukleinsäuresequenz kann

anschließend durch Schneiden mit einem Restriktionsenzym, das eine Nukleinsäuresequenz in dem ursprünglichen Anchor-Oligonukleotid spezifisch erkennt, von dem an der Matrix verbleibenden Anchor-Oligonukleotid abgetrennt werden. Die aufligierte Nukleinsäuresequenz hängt nun an dem zuletzt anligierten Splinker-Oligonukleotid. Das verlängerte Splinker-Oligonukleotid wird nach Inaktivierung des Restriktionsenzym aus dem ursprünglichen Reaktionsansatz in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dort mit einem aufligierten Anchor-Oligonukleotid verknüpft, das mit einem Splinker-Oligonukleotid spezifischen Restriktionsenzym geschnitten wurde (1. Transposition). Dem Fachmann ist ersichtlich, daß es sich bei den aufligierten Nukleinsäuresequenzen um frei wählbare Sequenzen handeln kann, die sowohl unterschiedlich als auch identisch sein können. Das aus der 1. Transposition resultierende Ligationsprodukt wird wiederum mit einer Anchor-spezifischen Restriktionsendonuklease geschnitten und erneut mit einem analog erhaltenen aufligierten Anchor-Oligonukleotid ligiert (2. Transposition). Auf diese Weise verdoppelt sich die Länge der aufligierten Nukleinsäuresequenzen dann mit jedem weiteren Schritt. Die Verknüpfung der DNA-Fragmente erfolgt jeweils über komplementäre Überhänge, ist aber ansonsten vollkommen sequenzunabhängig. Die einzige Einschränkung dabei ist, daß die Anchor- und Splinker-spezifischen Restriktionsschnittstellen in der zu synthetisierenden Sequenz nicht vorkommen dürfen, weil sonst die DNA auch intern geschnitten werden würde. Jeweils vor einer Spaltung an einer Anchor-spezifischen Restriktionsschnittstelle und der darauf folgenden Transposition kann fakultativ ein Exonukleaseschritt eingeführt werden, um die Transposition nicht vollständig aufligierter Splinker-Oligonukleotide zu verhindern.

Ausgehend von einer 20 Basenpaaren langen Sequenz (die man für Splinker mit einem 4 nt Überhang durch 5 sukzessive Ligationen der hierfür benötigten Ursprungs-Splinker aus der Bibliothek erhalten kann), läßt sich durch lediglich 7 weitere Ligationsschritte eine doppelsträngige DNA-Sequenz von 2560 Basenpaaren Länge synthetisieren. Bei Zykluszeiten von ca. 1 Stunde kann eine beliebige DNA-Sequenz dieser Länge binnen 12 Stunden synthetisiert werden. Durch eine Optimierung der Reaktionsbedingungen kann der Zeitaufwand auf etwa 6 Stunden halbiert werden.

30

Bei 4 Nukleotide langen Überhängen wird eine Bibliothek von 65536 verschiedenen Splinker-Oligonukleotiden benötigt, um alle möglichen Nukleinsäuresequenzen herstellen zu können. Diese Zahl ergibt sich aus folgender Berechnung: es gibt 256 mögliche 4 Nukleotide lange

Überhänge ($4^4 = 256$), ebenso viele Sequenzvarianten existieren für die vier direkt angrenzenden Nukleotide, die den Überhang beim nächsten Ligationsschritt bilden. Insgesamt ergibt sich daraus eine Gesamtzahl von $4^4 \text{ mal } 4^4 = 4^8 = 65536$. Splinker-Oligonukleotide, mit denen sämtliche möglichen Sequenzvarianten dargestellt werden können. Bei 3 Nukleotide langen
5 Überhängen reduziert sich die Komplexität der benötigten Splinkerbibliothek entsprechend auf $4^3 \text{ mal } 4^3 = 4096$, bei 5 Nukleotide langen Überhängen würde sie sich auf $4^5 \text{ mal } 4^5 = 1048576$ erhöhen. Voraussetzung für dieses Baukastensystem ist das Vorhandensein einer kompletten Splinkerbibliothek (für 3 nt Überhänge 4096 Oligonukleotide, für 4 nt Überhänge 65536 Oligonukleotide, für 5 nt Überhänge 1048576 Oligonukleotide) sowie einer Anchorbibliothek
10 (256 Oligonukleotide). Letztere ist allerdings nicht unbedingt nötig, da die 256 verschiedenen Überhangsequenzen ebenso gut durch einen vorgeschalteten Ligationsschritt mit einem geeigneten Splinker-Oligonukleotid erzeugt werden können.

Prinzipiell sind alle Einzelschritte des erfindungsgemäßen Verfahrens automatisierbar, so daß die
15 Herstellung ganzer Gene so einfach ist wie die Synthese von Oligonukleotiden. Zudem eröffnet sich durch das erfindungsgemäße Verfahren ein Kostensenkungspotential in beträchtlicher Höhe. Erstens können alle benötigten Enzyme großtechnisch hergestellt werden. Zweitens können die Investitionen für die Splinkerlibrary deutlich gesenkt werden, indem die einzelnen Splinker-Oligonukleotide bis auf die letzten 4 Nukleotide des 5'-Überhangs *en bloc* synthetisiert werden.
20 Die Synthesereaktion wird dann in 4 gleiche Teile portioniert; die vier verschiedenen Nukleotide werden dann in separaten Reaktionen an der nächsten (im Endprodukt viertletzten) Position angehängt. Danach werden die vier Einzelreaktionen wiederum geviertelt, wonach das drittletzte Nukleotid angehängt wird usw. Statt 65536 Einzelsynthesen würde man dann nur 256 Synthesen in einem entsprechend größeren und deswegen günstigeren Maßstab benötigen. Ferner können
25 die 256 möglichen 4 Nukleotide langen Überhänge durch eine "blunt end ligation" an 256 verschiedene Anchor-Oligonukleotide, anschließender Exonukleasebehandlung, Waschen und schließlich Restriktion mit der *Anchor*-spezifischen Restriktionsendonuklease erzeugt werden. Auf diese Weise könnten die 65536 benötigten Splinker-Oligonukleotide kostengünstig hergestellt werden. Ferner könnte auf diese Art und Weise eine aufwendige Aufreinigung aller
30 65536 Splinker-Oligonukleotide umgangen werden, da nichtreaktive Fehlsequenzen durch dieses Verfahren entfernt werden. Da eine extrem hohe Reinheit der eingesetzten Oligonukleotide essentiell für das Gelingen fehlerloser Synthesen ist, müssen diese sowieso entsprechend vorbehandelt werden. Daneben muß eine praktisch vollständige Abwesenheit von Exonukleasen

während der Restriktions- und Ligationsschritte gewährleistet sein, damit die Überhangsequenzen intakt bleiben, die für die nachfolgenden Ligationen benötigt werden. Vor allem wenn Exonuklease-Zwischenschritte zur Entfernung nichtligierter Anchor-Oligonukleotide verwendet werden, müssen diese Exonukleasen gründlich gewaschen und/oder inaktiviert werden.

5

Die Anchor- und Splinker-Oligonukleotide können sowohl jeweils aus einem selbstkomplementären Einzelstrang als auch aus je zwei komplementären Plus- und Minus-Strängen zusammengesetzt werden. Die Nukleinsäuresequenzen müssen nicht vollständig komplementär sein, die selbstkomplementären Einzelstrang-Oligonukleotide können einen Loop aufweisen und die komplementären Plus- und Minus-Stränge können nur teilweise komplementär sein. Bei Anchor- und Splinker-Oligonukleotiden, die aus je zwei komplementären Plus- und Minus-Strängen zusammengesetzt sind, muß (i) die Schmelztemperatur des Doppelstranghybrids genügend hoch sein, um eine Denaturierung der zusammengesetzten Anchor- und Splinker-Oligonukleotide und einen möglicherweise daraus resultierenden unbeabsichtigten Transfer der nicht an eine Festphase gekoppelten Einzelstränge zu verhindern und müssen (ii) die jeweils nicht zu verlängernden Enden durch geeignete Modifikationen blockiert sein. Oligonukleotide aus zwei komplementären Plus- und Minus-Strängen besitzen gegenüber Oligonukleotiden aus einem selbstkomplementären Einzelstrang bestimmte Vorteile. Selbstkomplementäre (Snap back) Oligonukleotide verursachen bei der Aufreinigung oft gewisse Schwierigkeiten, da sie in hoher Konzentration eine Tendenz zur Bildung von Netzwerken haben. Einzelsträngige Teiloligonukleotide sind auch kürzer und dadurch mit geringerem Aufwand in höherer Reinheit zu gewinnen. Für bestimmte erfindungsgemäße Ausführungsformen werden aus zwei Teiloligonukleotiden zusammengesetzte ("bi-partite") Anchor-Oligonukleotide verwendet.

25

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zur Herstellung der Nukleinsäuresequenz nach dem erfindungsgemäßen Verfahren. Das Kit kann aus einer Bibliothek aller notwendigen Anchor- und Splinker-Oligonukleotide, ferner einer festen Phase, an welche die Anchor-Oligonukleotide gekoppelt werden können, vorzugsweise magnetisierte Beads, geeigneten Reaktionsbehältnissen, Ligase, gegebenenfalls einer 3'-5'-Exonuklease und/oder Phosphatase, mindestens zwei verschiedenen TypII-Restriktionsendonukleasen, die außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden sowie aller benötigten Reaktionspuffer bestehen. Bevorzugt ist fernerhin eine Pipettierstation mit einem kühlbaren Probenvorratsbehälter mit einer

30

entsprechenden Softwaresteuerung, die sämtliche Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens automatisch durchführt.

Nachstehend werden bestimmte Aspekte der vorliegenden Erfindung beispielhaft
5 wiedergegeben, die auf der Komplettsynthese ganzer Gene durch das erfindungsgemäße Verfahren beruhen.

1. Herstellung einer cDNA, wenn nur die Proteinsequenz bekannt ist

10 Es kommt häufig vor, daß nur die Aminosäuresequenz oder Teile der Aminosäuresequenz eines Proteins bekannt sind, jedoch nicht die cDNA oder genomische Sequenz. Wegen der Degeneration des genetischen Codes ist es in der Regel nicht möglich, das entsprechende Gen direkt über eine PCR einer geeigneten cDNA-Bank zu amplifizieren. Man sucht daher Regionen, in denen Aminosäuren wie Tryptophan, Methionin bzw. Asparagin, Aspartat, Glutamat, Glutamin,
15 Tyrosin, Phenylalanin, Cystein oder Lysin gehäuft auftreten, da es für diese Aminosäuren nur ein bzw. zwei Codons gibt. Sofern es gelingt, mit niedrig degenerierten Primern ein PCR-Fragment der erwarteten Größe zu erhalten, wird dieses als Sonde benutzt, um das dazugehörige Gen aus einer cDNA-Bank zu klonieren. Diese Arbeit wird zwar heutzutage durch die Verfügbarkeit von Gene-Arrays und Klonkollektionen in vielen Fällen wesentlich erleichtert, doch zum einen
20 stehen solche Hilfsmittel nur für eine begrenzte Anzahl von Organismen und Zelltypen zur Verfügung, zum anderen ist selbst bei Vorliegen der kompletten cDNA meist noch eine Umklonierung in einen geeigneten Expressionsvektor erforderlich. Der Zeitaufwand kann je nach Schwierigkeit des Projekts bei ein bis zwei Wochen, in Extremfällen aber durchaus auch bei mehreren Monaten bis Jahren liegen. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann
25 ausgehend von einer bekannten Proteinsequenz ein Expressionskonstrukt mit einem für den gewünschten Organismus optimierten Codon Usage in ein bis zwei Tagen hergestellt werden. Hierfür muß der Organismus, in dem das Protein natürlicherweise exprimiert wird, gar nicht zur Verfügung stehen, da die DNA-Sequenz aus der bekannten Proteinsequenz abgeleitet werden kann, ohne daß ein Template vorliegen muß. Mit verbesserten Proteinsequenzierungsmethoden
30 wird es in Zukunft möglich sein, Proteine mit interessanten Enzymaktivitäten aus beliebigen Organismen zu sequenzieren und ohne den Umweg über die cDNA-Klonierung mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens direkt in jedes gewünschte Expressionssystem zu überführen.

2. *Herstellung von Designergenen und Designerproteinen*

Eine weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die einfache Herstellung von Designergenen bzw. Designerproteinen, d.h. die Kopplung funktioneller Domänen verschiedener Proteine, um
 5 beispielsweise Enzyme mit neuen oder veränderten Eigenschaften herzustellen. Bei Kenntnis der Röntgenkristallstruktur eines Proteins können dann sehr gezielte Veränderungen wie z.B. die Einfügung definierter Linkerdomänen oder ein Redesign einer Bindungstasche vorgenommen werden, um neue Funktionen oder veränderte Spezifitäten in Proteine einzuführen. Durch zielgerichtetes Proteindesign kann man beispielsweise regulierbare katalytische Zentren
 10 konstruieren, die durch eine Konformationsänderung des Proteins infolge der Bindung eines spezifischen Liganden aktiviert werden. Auf diese Weise können Designerproteine hergestellt werden, die z.B. auf die Bindung eines bestimmten Virusproteins hin eine Caspase-Aktivität entfalten, die dann in infizierten Zellen Apoptose auslöst. Erste Versionen solcher hochspezifischen Pharmaka sind bereits beschrieben worden; vgl. Vocero-Akbani A.M., Heyden
 15 N.V., Lissy N.A., Ratner L., Dowdy S.F., *Nat Med*, 1999 Jan, 5:1, 29-33. Weiterhin können Proteine dadurch stabilisiert werden, daß an bestimmten Positionen Aminosäuren eingebaut werden, die zusätzliche Salzbrücken bilden können. Somit kann die Toleranz gegenüber hohen Temperaturen verbessert werden, was unter anderem für die Waschmittelindustrie vorteilhaft ist. Sofern die Domänstrukturen bekannt sind, kann durch die punktgenaue Expression bestimmter
 20 funktioneller Regionen eine gewünschte enzymatische Aktivität von einer unerwünschten getrennt werden. Ebenso lassen sich Multienzymkomplexe konstruieren, die eine ganze Reihe verschiedener Reaktionen katalysieren können. Dadurch lassen sich Verbesserungen bei der Synthese vieler organischer Verbindungen erreichen oder manche Synthesen sogar erst ermöglichen. Dies eröffnet ganz neue Perspektiven, da viele organische Synthesen, bei denen
 25 heute noch umweltgefährdende Lösungsmittel und Katalysatoren eingesetzt werden müssen, in Zukunft durch solche maßgeschneiderten Biokatalysatoren ersetzt werden können.

3. *Systematische Mutagenese als Ersatz für randomisierte Mutagenisierung*

30 Eine häufig vorkommende Aufgabe in der biochemisch orientierten Molekularbiologie besteht darin, aus vielen Proteinvarianten diejenige herauszusuchen, die die höchste enzymatische Aktivität oder die stärkste Bindung an ein Substrat oder ein anderes Protein aufweist. Man geht dann meist so vor, daß man eine Reihe von zufälligen Mutationen von einer oder mehreren

Aminosäuren einführt und die entstehenden Varianten in einem geeigneten Screening-Verfahren analysiert. Zwar ist es prinzipiell auch möglich, alle Mutanten separat herzustellen, jedoch wird dies aus Zeit- und Kostengründen selten durchgeführt. Bei einer randomisierten Mutagenisierung ist die Kontrolle über die entstehenden Mutanten naturgemäß sehr limitiert, zum einen da bestimmte Aminosäuresubstitutionen verfahrensbedingt häufiger gefunden werden als andere, zum anderen, da es sich kaum vermeiden lässt, daß bei diesem Verfahren auch Stopcodons eingeführt werden. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich hingegen alle gewünschten Mutanten gezielt und ohne großen Aufwand darstellen und als Proteine exprimieren.

4. *Herstellung synthetischer Gene, insbesondere zum Einsatz als DNA-Vakzine*

In vielen Fällen ist es wünschenswert, die Proteinexpression bestimmter Gene in heterologen Systemen zu optimieren. Dies kann durch die Verwendung starker Promotoren sehr häufig nur zum Teil erreicht werden. Je nachdem, welcher Organismus für die Expression verwendet wird, kann sich die Verwendung bestimmter Codons für eine Aminosäure vorteilhaft oder nachteilhaft auf die erreichbare Genexpression auswirken. So sind beispielsweise viele retrovirale Genprodukte in eukaryotischen Zellen nur schlecht translatierbar, da sie meist sehr AT-reich sind und in höheren Eukaryonten seltene Codons benutzen. Speziell für den Einsatz solcher Gensequenzen als DNA-Vakzine ist es daher von großem Vorteil, wenn deren Codongebrauch für Säugerzellen optimiert ist. Desgleichen können bestimmte RNA-Strukturen zu einer Instabilität der Transkripte führen, was die Genexpression ebenfalls negativ beeinflussen kann. Solche Elemente können durch Codonveränderungen mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ebenfalls leicht ausgeschaltet werden.

5. *Analyse von Proteindomänen durch Deletions- oder Punktmutagenese*

Die Analyse von Mutanten ist sehr oft das Mittel der Wahl bei der funktionellen Charakterisierung von Proteinen. Zwar existiert sowohl für die Herstellung von Deletions- wie auch Punktmutanten eine Reihe etablierter Verfahren, jedoch sind diese in der Regel sehr zeitaufwendig und arbeitsintensiv. Deletionen werden meist durch Einführen von Linkersequenzen oder durch eine PCR mit Primern, deren Enden zu verschiedenen Teilsequenzen komplementär sind, hergestellt. Um eine ganze Serie definierter Deletionen zu erhalten, ist häufig ein

Zweischrittverfahren notwendig, bei dem zunächst bestimmte Restriktionsschnittstellen eingeführt werden, über welche dann die gewünschten Deletionen eingeführt werden können. Mit entsprechend konzipierten Primern und einer Mehrfragmentligation lassen sich solche Deletionen zwar im Prinzip auch in einem Schritt herstellen, jedoch sind die Erfolgsaussichten dabei eher gering. In allen diesen Fällen muß die Wildtyp-DNA als Template vorliegen, was bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht notwendig ist. Darüber hinaus können Deletionsmutanten hergestellt werden, da es gar nicht notwendig ist, Restriktionsschnittstellen einzuführen, für die man erst geeignete Stellen finden muß, damit die eingeführten Mutationen keine Veränderungen in der Proteinsequenz bewirken (sogenannte "Silent site" Mutationen). Auch die Herstellung von Doppel- oder Tripletmutanten ist mit dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich. Für die funktionelle Kartierung eines Proteins können in dessen Gensequenz mittels der erwähnten "Silent site" Mutationen gleichzeitig auch Restriktionsschnittstellen für eine große Anzahl verschiedener Restriktionsendonukleasen eingeführt werden, mit deren Hilfe beliebige Deletionen hergestellt werden können. In vielen Fällen wird daher die klassische Mutationsanalyse verzichtbar und kann durch das schnellere und genauere erfindungsgemäße Verfahren ersetzt werden.

6. *Gekoppelte in vitro Transkriptions/Translationssysteme ("EasyPro™")*

Gekoppelte *in vitro* Transkriptions/Translationssysteme werden zur schnellen Synthese von Proteinen im analytischen Maßstab eingesetzt, z.B. für Bindungsstudien oder Kopräzipitationsassays. Hierfür werden die zu exprimierenden Sequenzen in einen Vektor kloniert, der einen Promoter für eine RNA-Polymerase enthält. Mit Hilfe dieser Polymerase wird mRNA transkribiert, die in einem RNA-depletierten Weizenkeim- oder Retikulozytenextrakt in das gewünschte Protein translatiert wird, das aufgrund der geringen Ausbeute und der einfacheren Nachweisbarkeit meist mit ^{35}S -Methionin oder Cystein radioaktiv markiert ist. Eine noch schnellere Alternative ist das auf dem erfindungsgemäßen Verfahren basierende EasyPro™-System. In einem Anchor-Oligonukleotid, welches einen T7 (SP6) Promoter, eine interne Ribosomenbindungsstelle sowie ein Hexahistidin-Tag enthält, wird durch Restriktion mit XcmI ein einzelner Thymidinüberhang erzeugt, der direkt mit einem PCR-Produkt ligiert werden kann. Drei EasyPro™-Anchor-Oligonukleotide mit verschiedenen Leserastern sind ausreichend, um alle in der richtigen Orientierung ligierten PCR-Fragmente zu translatieren. Mittels terminaler Transferase oder durch Ligation eines entsprechenden Splinker-Oligonukleotids an das 3'-Ende

des PCR-Produkts kann man zudem leicht einen künstlichen poly-A-Schwanz in das DNA-Template einführen, welcher das RNA-Transkript stabilisiert und dadurch für eine höhere Translationseffizienz sorgt. Ferner können die für das gewünschte Protein codierenden DNA-Sequenzen nach Spaltung mit einer Restriktionsendonuklease auch direkt an einen modifizierten
5 EasyPro™-Anchor mit einem passenden 4 nt langen Überhang ligiert werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Minireaktors zur schnellen Synthese von Proteinen. In der unteren Reaktionskammer des Minireaktors findet die Transkription der an Streptavidin-beschichtete Beads gekoppelten Expressions-Anchor-
10 Nukleinsäuresequenz statt. Die dabei entstehenden mRNAs werden über ihren 3'-poly-A-Schwanz an Oligo-dT gekoppelte Beads gebunden, welche sich ebenfalls in der unteren Reaktionskammer befinden. Dort läuft auch die Translation der mRNAs in einem Retikulozytenextrakt ab. Diese Kammer wird durch eine Ultrafiltrationsmembran mit einem MWCO (Molekulargewichtsausschluß) von ca. 200 kD von einer darüberliegenden zweiten
15 Kammer abgetrennt. Diese enthält Beads, welche das Protein von Interesse binden können (z.B. Ni²⁺-NTA-Beads für Proteine mit einem Hexahistidin-Tag). Durch eine kontinuierliche Zufuhr von Pufferlösung mit frischen niedermolekularen Reaktanden (Aminoacyl-tRNAs, Ribonukleotidtriphosphate, CAP-Analogon und Creatinphosphat) wird die Produktion über längere Zeit hinweg aufrechterhalten. Gleichzeitig wird dadurch das synthetisierte Protein aus
20 der unteren in die obere Reaktionskammer gedrückt, wo es an den Beads hängen bleibt. Alternativ kann diese Kammer durch eine weitere Ultrafiltrationsmembran abgeschlossen werden, deren Ausschluß so gewählt ist, daß sie für Puffer und kleinere Moleküle, nicht aber für das gewünschte Protein permeabel ist. Dieses sammelt sich daher in der oberen Kammer an und kann von dort in aufgereinigter Form isoliert werden. Die dabei erzielbaren Ausbeuten sind nicht
25 nur für die meisten analytischen Experimente ausreichend, sondern können sogar Proteinexpressionsexperimente im kleinen Maßstab ersetzen. Wenn es beispielsweise darum geht, die spezifische enzymatische Aktivität verschiedener Proteinmutanten zu bestimmen, mussten diese hierfür bislang in aufwendigen Vorversuchen kloniert, exprimiert und aufgereinigt werden. Da praktisch alle diese Schritte in dem erfindungsgemäßen EasyPro™-Verfahren bereits
30 integriert sind, wird dadurch ein erheblicher Zeitvorteil gegenüber konventionellen Methoden erreicht.

Mit einer Modifikation des vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahrens können

einfach und kostengünstig Peptidbibliotheken hergestellt werden, welche unter anderem zum Epitopmapping von Antikörpern oder zur Identifizierung immunogener Epitope in Proteinen von Viren, Bakterien oder Pilzen benötigt werden (zur schnellen Etablierung serologischer Nachweissysteme). Hierfür werden modifizierte EasyPro™-Anchor-Oligonukleotide sukzessive durch Splinkerligationen verlängert, so daß die für die gewünschten Peptide codierenden Sequenzen entstehen. Im letzten Schritt wird ein vorgefertigter Endsplinker anligiert, welcher für ein C-terminales Tag, ein Stopcodon sowie einen Poly-A-Schwanz codiert. Die Ligationsprodukte werden in dem beschriebenen Minireaktor transkribiert und translatiert. Die fertigen Peptide werden nach Abschluss der Translation und mehreren Waschschritten mit einer spezifischen Protease, z.B. Enterokinase oder Faktor Xa, an der vom EasyPro™-Anchor-Oligonukleotid codierten Schnittstelle abgespalten und aus der oberen Reaktionskammer ausgewaschen. Mit Hilfe des C-terminalen Tags können diese an eine feste Phase für nachfolgende Tests gebunden werden. Die Peptide liegen zudem schon in aufgereinigter Form vor und können direkt für nachfolgende Applikationen eingesetzt werden. Da jeweils das gleiche Anchor-Oligonukleotid verwendet wird und die benötigten Splinker-Oligonukleotide aus einem bereits vorgefertigten Teilstück in wenigen Schritten aufligiert werden können, sind die anfallenden Kosten geringer als bei einer konventionellen Peptidsynthese.

7. *Herstellung von Ribozymen oder Aptameren*

Analog zu der oben beschriebenen Proteinsynthese lassen sich Anchor-Oligonukleotide mit einem T7 (SP6) Promoter auch zur Herstellung und Mutagenisierung von RNAs verwenden. Das System eignet sich insbesondere zur Synthese verschiedener Ribozyme, da die für die Ribozyme codierenden DNA-Sequenzen auf einem verlängerten Splinker-Oligonukleotid an ein Promotormodul auf einem Anchor-Oligonukleotid anligiert werden können. Vor allem können genau definierte Ribozymtemplatebibliotheken erstellt werden, die sich per PCR leicht amplifizieren lassen. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können Ribozymtemplatesequenzen auf das Nukleotid genau hergestellt werden, ohne daß hierfür Klonierungsarbeiten notwendig sind. Durch Einführung von Linksequenzen kann man Ribozyme herstellen, die sich über eine zur Linksequenz komplementäre DNA/RNA an eine beliebige chemische Verbindung wie Peptide, Nukleinsäuren, aliphatische Kohlenwasserstoffe, Ester, Ether oder Alkohole koppeln lassen. Wenn diese Verbindung an eine feste Phase gebunden vorliegt, lassen sich Ribozyme selektionieren, die diese Bindung spalten. Diejenigen Ribozyme,

die sich selbst von der Bindung an die feste Phase "befreit" haben, können durch reverse Transkription und nachfolgende asymmetrische PCR in einzelsträngige DNA-Moleküle überführt werden. Diese werden dann über die Linksequenz an ein entsprechend modifiziertes Anchor-Oligonukleotid hybridisiert und ligiert. Das verwendete Anchor-Oligonukleotid ist so konstruiert, daß es einen T7-Promoter enthält, über den mit Hilfe der T7-Polymerase wieder das Ribozym erhalten werden kann. Durch die Verwendung einer ungenauen Reversen Transkriptase (z.B. HIV RT) lassen sich zufällige Mutationen einführen. Der Selektionsdruck kann durch immer kürzere Inkubationen erhöht werden, so daß präferentiell Ribozyme mit einer hohen Aktivität amplifiziert werden. Analog lassen sich nach demselben Prinzip auch Ribozyme mit der Fähigkeit selektionieren, eine Bindung zur festen Phase zu vermitteln.

8. *Verwendung von mit dem erfindungsgemäßen Verfahren produzierten ssDNAs in der Diagnostik (PathoCheck™)*

Bei der Diagnostik von Infektionskrankheiten wird üblicherweise häufig ein direkter Erregernachweis z.B. durch PCR verlangt. Besonders in der Transfusionsmedizin ist es wichtig, kontaminierte Blutproben sicher zu erkennen und auszusortieren. Die hierfür üblicherweise eingesetzten serologischen Assays können dies nur dann gewährleisten, wenn die Infektion des Spenders bereits einige Zeit zurückliegt, so daß bereits Antikörper gebildet worden sind. Während eines Fensters von bis zu 12 Wochen (in Extremfällen auch länger) sind beispielsweise bei der HIV-Infektion noch keine Antikörper im Blut nachweisbar, obwohl bereits eine massive Virusreplikation stattfindet. Da eine routinemäßige PCR-Untersuchung aller Proben aus Kostengründen vielerorts kaum machbar ist, wird diese (wenn überhaupt) an Pools von Einzelspenden durchgeführt. Die Problematik dabei ist, daß dadurch die an sich sehr hohe Sensitivität sinkt, da die Menge des für die Analyse eingesetzten Materials nicht beliebig erhöht werden kann. Bei Viruserkrankungen wie HIV, bei denen ein Großteil der Viren extrazellulär vorliegt, kann dies durch eine Konzentrierung der Viren durch Zentrifugation noch einigermaßen ausgeglichen werden, bei vorwiegend zellassozierten Viren funktioniert das allerdings meist weniger gut. Man kann zwar zunächst DNA oder RNA aus den Blutzellen isolieren, jedoch nur einen Bruchteil davon in der PCR-Reaktion einsetzen, da sonst unspezifische PCR-Produkte überhandnehmen. Daher muß in solchen Fällen eine Vorselektion des zu amplifizierenden Materials durchgeführt werden. Hierfür wird ein einzelsträngiges, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestelltes Produkt eingesetzt, das mit einem modifizierten Anchor-Oligonukleotid

hergestellt wird. In diesem Fall verwendet man ein Anchor-Oligonukleotid aus zwei getrennten komplementären Strängen, von denen der eine am 5'-Ende modifiziert, z.B. biotinyliert, ist, der andere am 3'-Ende blockiert ist. Nach der Synthese der Virus-Sequenz wird der nicht-biotinylierte Strang durch Waschen mit einer denaturierenden Lösung abgetrennt, so daß eine
 5 einzelsträngige Antisense-DNA verbleibt. Diese kann mit dem 5'-biotinylierten Teil-Anchor-Oligonukleotid und einem endständigen Oligonukleotid amplifiziert werden, sofern mehr Material benötigt wird. Von diesem PCR-Produkt ist nur ein Strang biotinyliert, der andere kann durch Denaturierung abgetrennt werden. Diese Antisense-DNA kann nun dafür eingesetzt werden, um virale RNAs oder DNAs aus einem komplexen Gemisch wie einem Zelllysate oder
 10 einer Nukleinsäurepräparation anzureichern, indem man diese miteinander hybridisiert, die Hybride an einen Streptavidin-beschichteten Träger (Support) bindet und nicht-hybridisierte Komponenten unter stringenten Bedingungen wegwäscht. In einem zweiten Schritt können die angereicherten RNAs oder DNAs dann mit einer konventionellen PCR mit Primern aus dem nicht-hybridisierten Teil der RNA oder DNA amplifiziert und nachgewiesen werden. Dies kann
 15 üblicherweise über Gelelektrophorese der Produkte geschehen oder durch Fluoreszenzanalyse oder durch einen nachgeschalteten ELISA, unter der Voraussetzung, daß ein entsprechend modifizierter Primer verwendet wurde. Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens sind, daß fast beliebig hohe Mengen an Ausgangsmaterial eingesetzt werden können, was die Sensitivität der Analyse verbessert, daß auch mehrere Targets gleichzeitig untersucht und bei Verwendung
 20 verschieden fluoreszenzmarkierter Primer auch differenziert werden können und daß es für beliebige Pathogene wie Bakterien, Pilze oder Viren einsetzbar ist. Durch die Voranreicherung der zu amplifizierenden Sequenzen werden nebenbei auch Hintergrundprobleme deutlich reduziert. Bei entsprechender Miniaturisierung kann eine große Anzahl verschiedener Pathogene gleichzeitig auf einem Chip getestet werden, wodurch die Analysekosten extrem gesenkt werden
 25 können.

9. "Gene Profiling" (GPro™)

In der molekularbiologischen Forschung und zunehmend auch in der molekularen Diagnostik
 30 wird die Expression bestimmter Gene auf der RNA-Ebene quantitativ untersucht. Standardwerkzeuge hierfür sind der Northern-Blot, das S1-Mapping oder der "Ribonuclease Protection Assay" (RPA), meist in Verbindung mit radioaktiv markierten Sonden. Die vorstehend beschriebenen einzelsträngigen DNAs können auch für diese Aufgabe verwendet werden. Eine

vorhergehende Aufreinigung der zu analysierenden RNAs, die meist eine zusätzliche Fehlerquelle darstellt, ist hierzu nicht notwendig. Ähnlich wie bei dem erfindungsgemäßen PathoCheck™-Verfahren werden die zu untersuchenden mRNAs mit einem Überschuss eines modifizierten z.B. biotinylierten Anchor-Oligonukleotids mit genspezifischen einzelsträngigen Antisense-DNAs hybridisiert und an einer z.B. Streptavidin-beschichteten festen Phase immobilisiert. Nach dem Auswaschen aller Proteine, nicht relevanter Nukleinsäuren und sonstiger Verunreinigungen werden die Ziel-mRNAs mit einer Reihe von direkt oder indirekt fluoreszenzmarkierten Splinkersequenzen, welche zu einem anderen Teil dieser mRNAs komplementär sind, nachgewiesen. Durch die Verwendung verschiedener genspezifischer Antisense-DNAs und unterschiedlich markierter Nachweissplinker-Oligonukleotide kann die Expression mehrerer Gene gleichzeitig analysiert werden. Das ganze Verfahren lässt sich ohne großen Aufwand vollständig automatisieren. Sofern die zu analysierenden Gewebe nicht übermäßig viel RNase enthalten, reicht eine Lyse in chaotropen Puffern und/oder Zugabe von RNasin aus, die Integrität der RNAs zu gewährleisten. Wenn maximale Sensitivität wichtiger ist als der gleichzeitige Nachweis verschiedener mRNAs in einem Reaktionsansatz, können anstelle der fluoreszenzbasierten Nachweisreagenzien auch Antikörper eingesetzt werden, welche an ein polyvalentes Sekundärreagenz binden wie ein anti-Maus-Ig-Peroxidase-Polymer. Diese Komplexe werden dann in einer nachgeschalteten Enzymreaktion detektiert z.B. durch die beim Umsetzen eines geeigneten Substrats entstehende Chemilumineszenz. Für besonders häufig gemachte Untersuchungen können entsprechende GPro™-Kits mit synthetischen Kontroll-mRNAs als quantitative Standards bereits fertig konfektioniert werden.

10. *Allelidentifizierung durch hybridvermittelte Ligation (LIMA™; Ligation mediated Identification of Mutant Alleles)*

25

Besonders in der Pränataldiagnostik von Erbkrankheiten, aber auch zur Bestimmung der individuellen Sensitivität gegenüber verschiedenen Arzneimitteln muß der Genotyp bestimmter Allele festgestellt werden. In der Regel geschieht dies durch eine PCR-Amplifikation des zu untersuchenden Locus aus der genomischen DNA und anschließende Restriktionsanalyse oder Sequenzierung. Im ersten Fall bedingt dies eine gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente, die nicht ohne weiteres automatisierbar ist. Das trifft auch im zweiten Fall zu, sofern nicht mit der Chipsequenzierungsmethode gearbeitet wird, die jedoch noch nicht ausgereift ist. Auch für diesen Aspekt lassen sich erfindungsgemäß hergestellte DNA-Fragmente

30

verwenden. Voraussetzung hierfür ist, daß es sich um bekannte, molekular identifizierte Allele handeln muß. Ein erfindungsgemäß hergestelltes Anchor-Oligonukleotid wird dann so konstruiert, daß es an eine Genregion hybridisiert, die unmittelbar vor der Mutation liegt. Ein weiteres Oligonukleotid, das ein oder mehrere fluoreszierende Markierungen enthält, hybridisiert an die direkt angrenzende 3'-Region des Gens, so daß die beiden freien Enden der erfindungsgemäß hergestellten Anchor-Oligonukleotid-DNA und des fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids bei durchgängiger Hybridbildung direkt nebeneinander zu liegen kommen und miteinander ligiert werden können. Sofern die Sequenz an dieser Stelle abweicht, kommt es nicht zur Anlagerung der Enden und damit auch nicht zur Ligation. Stattdessen kann z.B. ein mit einer anderen Fluoreszenz markiertes Oligonukleotid an die entsprechende mutierte Sequenz binden, wodurch eine andere Markierung an den biotinylierten Anchor ligiert wird. Durch Laseranregung werden die jeweils gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe und damit die jeweiligen Allele identifiziert. Zur Erhöhung der Sensitivität des erfindungsgemäßen Verfahrens kann auch in diesem Fall eine asymmetrische PCR vorgeschaltet werden, welche den zu untersuchenden Locus amplifiziert. Bei einheitlichen Reaktionsbedingungen für die PCR und Hybridisierung ist es möglich, mehrere verschiedene Allele gleichzeitig aus einer Probe zu bestimmen.

11. Direkte Interaktionsanalyse von Protein Arrays (LISPA™)

Mit dem Erfolg des "Human Genome Project" steht als eine der nächsten Aufgaben die Klassifizierung der ca. 50.000 menschlichen Gene an. Nicht nur in der Grundlagenforschung, sondern auch in dem sich rasch fortentwickelnden Gebiet der molekularen Medizin ist es wichtig zu verstehen, was diese Gene tun, wie sie in welchen Situationen miteinander kooperieren, welche Proteine, Peptide oder niedermolekularen Stoffe an welche anderen Proteine binden etc. Ein erster Anhaltspunkt für solche Kooperationen zwischen Proteinen ist meist ein direkter physischer Kontakt der jeweiligen Genprodukte. Um solche Bindungen *in vitro* auf der Proteinebene untersuchen zu können, benötigt man in der Regel aufgereinigte Proteinpräparationen. Bei 50.000 Proteinen ist dies jedoch nicht ohne weiteres möglich. Man behilft sich daher zumeist mit genetischen Methoden wie z.B. dem sogenannten "Yeast Two Hybrid Screen", um mögliche Interaktionspartner zu identifizieren. So erfolgreich diese Methode bisher auch eingesetzt worden ist, ist sie dennoch extrem artefaktanfällig, umständlich und für die Komplexität der nun anstehenden Aufgabe ungeeignet. Diese Aufgabe kann mit einer Kombination des erfindungsgemäßen Verfahrens, des Sloning™-Verfahrens, und dem

erfindungsgemäßen EasyPro™-Verfahren in Verbindung mit einem Biochip durchgeführt werden. Mittels einer Automatisierung können die kompletten 50.000 Gene synthetisiert, exprimiert und mit einem geeigneten Tag zur Immobilisierung in Reaktionskammern eines Biochips versehen werden. Für Bindungsstudien mit einem fluoreszenzmarkierten Protein oder einer niedermolekularen chemischen Verbindung ist eine Menge von 10^7 bis 10^8 Molekülen üblicherweise ausreichend. In Kavitäten von $100 \times 200 \times 60 \mu\text{m}$ können etwa 1 Nanoliter einer Proteinelösung deponiert werden, dies entspricht bei einem 100 kD Protein und einer Konzentration von 5 mg/ml ca. 3×10^{10} Molekülen. Geht man davon aus, daß die tatsächliche Bindungskapazität pro Kavität bei ca. 1% dieses Werts liegt, ist auch bei relativ großen Proteinen noch ausreichend Material vorhanden. Wenn die einzelnen Kavitäten ca. $30 \mu\text{m}$ auseinanderliegen, so könnte die gesamte Bibliothek von 50.000 Proteinen auf einem Chip von nur 20 cm^2 untergebracht werden. Ein Laser mißt die Fluoreszenz in sämtlichen Kavitäten vor und nach der Bindung des fluoreszenzmarkierten Zielmoleküls, woraus man die Stärke der Interaktion berechnet. Kavitäten, in denen nur das Tag präsentiert wird, dienen als unspezifische Kontrolle. Mit Hilfe solcher Proteinarrays lassen sich beispielsweise bislang nicht feststellbare Bindungen von Arzneimitteln an zelluläre Proteine detektieren oder auch komplizierte Signaltransduktionskaskaden nachvollziehen.

12. Parallele Analyse von mRNAs mit immobilisierten Nukleinsäure Arrays (PAMINA™)

Einer der Schwerpunkte der modernen Arzneimittelforschung besteht in dem gezielten Eingriff in die Expression einzelner Gene. Dazu muß der Einfluss von neuen Wirkstoffen auf die Expression anderer Gene möglichst umfassend untersucht werden. Bei Signalübertragungsprozessen, der Zelldifferenzierung oder bei krankheitsinduzierten metabolischen Veränderungen wird oft eine ganze Kaskade verschiedener Gene an- oder abgeschaltet. Aufgrund der Komplexität der Genexpression in höheren Organismen ist es aber bis jetzt praktisch nicht möglich, mehr als eine Handvoll Gene gleichzeitig zu analysieren. Mit der Sequenzierung des menschlichen Genoms werden in Zukunft jedoch die Grundvoraussetzungen für eine umfassende parallele Analyse der gesamten Genexpression einer Zelle geschaffen werden. Aus den vorliegenden Sequenzinformationen lassen sich durch computerisierte Sequenzvergleiche zunächst die Regionen in den einzelnen Genen identifizieren, die die geringste Homologie untereinander aufweisen, also den höchsten Grad an Spezifität für das jeweilige Gen. Aus diesen Genabschnitten können genspezifische, einzelsträngige Antisense-

Anchor-DNAs abgeleitet werden, die in einem Array auf einem Biochip immobilisiert werden. Die Antisense-Anchor-DNAs können so konzipiert werden, daß die Schmelztemperaturen sämtlicher RNA/DNA-Hybride in einem engen Fenster liegen. Durch Hybridisierung der gesamten RNA, bzw. der polyA⁺-RNA der zu untersuchenden Zellen an diesen Array unter

5 Bedingungen maximaler Stringenz werden in jeder Kavität des Biochips RNA/DNA-Hybride erzeugt, falls die korrespondierende mRNA exprimiert wird. In einem 2. Schritt werden die immobilisierten Antisense-Anchor-DNAs an dem hybridisierten RNA-Template durch Behandlung mit einer RNaseH Reversen Transkriptase und modifizierten Nukleotiden, die vorzugsweise fluoreszenzmarkiert sind, verlängert. Nach mehreren Waschvorgängen, um nicht

10 inkorporierte Nukleotide abzutrennen, können die cDNA-Reaktionsprodukte analog zu der beschriebenen LISPATM-Technik durch Laserabtastung der einzelnen Kavitäten gemessen werden.

Ausführungsbeispiele

15

1. Herstellung der Anchor- und Splinkeroligonukleotide

Die Anchor- und Splinker-Oligonukleotide wurden nach dem von Sinha N.D., Biernat J., McManus J., Köster H., *Nucleic Acids Res*, 1984 Jun, 12:11, 4539-57 beschriebenen Standardverfahren hergestellt oder durch eine Synthese in großem Maßstab, die nacheinander

20 geviertelt wurde oder durch Simultansynthese auf Cellulosemembranen.

2. Markierung mit einer Modifikation

Modifikationen in den Oligonukleotiden wurden mit Standardverfahren durchgeführt.

25 3. Kopplung an die Matrix

Zu 10 µl Streptavidin-gekoppelten magnetisierten Beads (MERCK) in einem Gesamtvolumen von 50 µl in 1xTE/1 M NaCl, pH 7.5 wurden 20-200 pmol Biotin-markierte kinasierte Anchor-Oligonukleotide zugesetzt und 30 min bei Raumtemperatur auf einem Roller inkubiert. Anschließend wurden nicht gebundene Anchor-Oligonukleotide durch einen dreimaligen

30 Pufferwechsel von je 500 µl 1xTE, pH 7.5 gewaschen.

3. Erster Ligationsschritt

Die Ligation erfolgte bei 4°C, 16°C, Raumtemperatur bzw. 37°C (Standard 16°C) in einem

Volumen von 50 µl in 1 x Ligasepuffer (Boehringer Mannheim) mit 1 bis 5 Einheiten T4-DNA Ligase (Boehringer Mannheim oder New England Biolabs) für 15 bis 60 Minuten. Für die Ligation wurden in der Regel 20 pmol phosphoryliertes Anchor-Oligonukleotid eingesetzt. Am 5'-Ende phosphorylierte Splinker-Oligonukleotide wurden in 1,5 bis 5fachem molaren Überschuß zugegeben. Nach der Reaktion wurden Ligase und nicht-ligierte Splinker-Oligonukleotide durch drei Pufferwechsel von je 500 µl 1xTE, pH 7.5 gewegewaschen. Danach wurde zu den gewaschenen Beads 40 µl eines Restriktionsmixes gegeben, der das Splinker-spezifische Restriktionsenzym Eco31I in 1,25x Restriktionspuffer (Puffer A von Boehringer Mannheim bzw. Puffer 4 von New England Biolabs) enthielt. Danach wurde wie vorstehend beschrieben gewaschen.

5. Zweiter Ligationsschritt

Es wurden vier weitere Ligationen mit weiteren Splinker-Oligonukleotiden nach der unter Punkt 4 aufgeführten Vorschrift durchgeführt.

6. Transposition

Nach der 5. Ligation wurde nach dem Waschen ein Mix des Anchor-spezifischen Restriktionsenzym Esp3I bzw. BpiI in den entsprechenden herstellerspezifischen Puffern hinzugefügt und 30 bis 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Reaktion wurde der komplette Mix mitsamt den abgeschnittenen aufligierten Splinker-Oligonukleotiden entfernt, in einem separaten Reaktionsgefäß 15 Minuten bei 65°C hitzebehandelt, um das Restriktionsenzym zu inaktivieren und sodann in ein weiteres Reaktionsgefäß mit entsprechend aufligierten, an magnetisierte Streptavidin-Beads gekoppelte Anchor-Oligonukleotide ligiert.

7. Restriktionskontrolle ligierter Fragmente

Zur Kontrolle der korrekten Größe der geschnittenen Splinker-Oligonukleotide wurde ein 5 µl Aliquot der Reaktion auf einem 18%igen 1xTBE-Polyacrylamidgel aufgetrennt, mit SYBR-Gold™ für 10 min in 0,01% in 1 x TBE angefärbt und mit UV-Licht sichtbar gemacht. Auf einem solchen Gel können Längenunterschiede von 1-2 Basenpaaren erkannt werden.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> DIAVIR GmbH
 5 <120> Verfahren zur Synthese von DNA-Fragmenten
 <130> DV-001
 10 <141> 1999-06-07
 <160> 7
 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 20 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen
 Sequenz:Oligonukleotid
 <400> 1
 gcttcgagac gcgttttcgc gtctcg 26
 30 <210> 2
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 35 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen
 Sequenz:Oligonukleotid
 <400> 2
 agaatggtct tcgagctttt gctcgaagac ca 32
 40 <210> 3
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen
 Sequenz:Oligonukleotid
 50 <400> 3
 cgcgatccg cggcgt 16
 55 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 60 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen
 Sequenz:Oligonukleotid
 65 <400> 4
 cgagacgccg cgatccgcg 20

<210> 5
<211> 34
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
5
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid
10 <400> 5
aagcttctgg agaccgcttt tgcggtctcc agaa 34

<210> 6
15 <211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
20 <223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid

<400> 6
ctcgaagcgg agaccgccac 20

<210> 7
<211> 16
<212> DNA
30 <213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid
35 <400> 7
gtggcggtct ccgctt 16

40

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, umfassend die Schritte
 - a) Kopplung eines Oligonukleotids an eine feste Matrix,
 - b) Zugabe eines weiteren Oligonukleotids,
 - c) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt a) und b),
 - d) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem außerhalb der Erkennungssequenz spaltenden Restriktionsenzym, wobei die Spaltung in der Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotids aus Schritt b) stattfindet,
 - e) Abtrennen des Reaktionsgemisches vom in Schritt d) erhaltenen verlängerten Oligonukleotid aus Schritt a),
 - f) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte b) bis e).
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei nach Schritt c) als Schritt c)' eine Exonuklease- und/oder Phosphatase-Reaktion durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Reaktionsgemisch des Schrittes c)' nach der Reaktion entfernt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei in der letzten Wiederholung der Schritte b) bis e) der Schritt d) nicht durchgeführt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die erhaltene Nukleinsäuresequenz durch Restriktionsspaltung vom Oligonukleotid aus Schritt a) abgetrennt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Kopplung des Oligonukleotids aus Schritt a) an die feste Matrix über eine Modifikation erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Modifikation ein Biotinrest, ein Digoxigeninrest, ein Fluoresceinisothiocyanatrest, eine Aminoverbindung oder ein Succinylester ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Oligonukleotid aus Schritt a) und/oder b) über einen Loop verfügt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Oligonukleotid aus Schritt a) über eine
5 Modifikation im Loopbereich an die feste Matrix gekoppelt ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die feste Matrix ein Kügelchen (bead), vorzugsweise aus Glas oder Polystyrol, die Vertiefung einer Mikrotiterplatte (well) oder ein Reaktionsröhrchen ist.

10

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die feste Matrix einen magnetisierten Streptavidinrest, einen anti-Digoxigenin-Antikörper oder anti-Fluoresceinisothiocyanat-Antikörper umfaßt.

15 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Oligonukleotide aus Schritt a) und b) an ihren zu ligierenden Enden über zueinander komplementäre Einzelstrangüberhänge verfügen.

20 13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Einzelstrangüberhänge 2, 3, 4 oder 5 Nukleotide lang sind.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die Nukleinsäuresequenz eine cDNA-Sequenz, eine Designersequenz, eine synthetische Sequenz oder eine modifizierte Sequenz ist.

25

15. Kit zur Herstellung einer Nukleinsäuresequenz nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, umfassend

- a) ein an eine feste Matrix koppelbares Oligonukleotid,
- b) mindestens zwei weitere Oligonukleotide.

30

16. Kit nach Anspruch 15, ferner umfassend eine Matrix und/oder eine Ligase und/oder ein oder mehrere Restriktionsenzym(e) und/oder eine Exonuklease und/oder eine Phosphatase.

17. Nukleinsäure, hergestellt nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14.

18. Verwendung der Nukleinsäure nach Anspruch 17 als DNA-Vakzine, zur Analyse von Proteindomänen, als Matrize für Designerproteine, zur schnellen Proteinsynthese, zur
5 Herstellung von Ribozymen oder Aptameren, als Sonde zum Nachweis pathogener Mikroorganismen, als Sonde zum Nachweis der Expression von Genen, zum Nachweis allelspezifischer Mutationen, zum Nachweis von Protein/Protein-Bindung, Protein/Peptid-Bindung und/oder der Bindung niedermolekularer Stoffe an Proteine.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, umfassend die Schritte

- 5 a) Kopplung eines Oligonukleotids an eine feste Matrix,
- b) Zugabe eines weiteren Oligonukleotids,
- c) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt a) und b),
- d) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem außerhalb der
10 Erkennungssequenz spaltenden Restriktionsenzym, wobei die Spaltung in der
 Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotids aus Schritt b) stattfindet,
- e) Abtrennen des Reaktionsgemisches vom in Schritt d) erhaltenen verlängerten
 Oligonukleotid aus Schritt a),
- f) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte b) bis e).

Anchor oligo

Splinker oligo

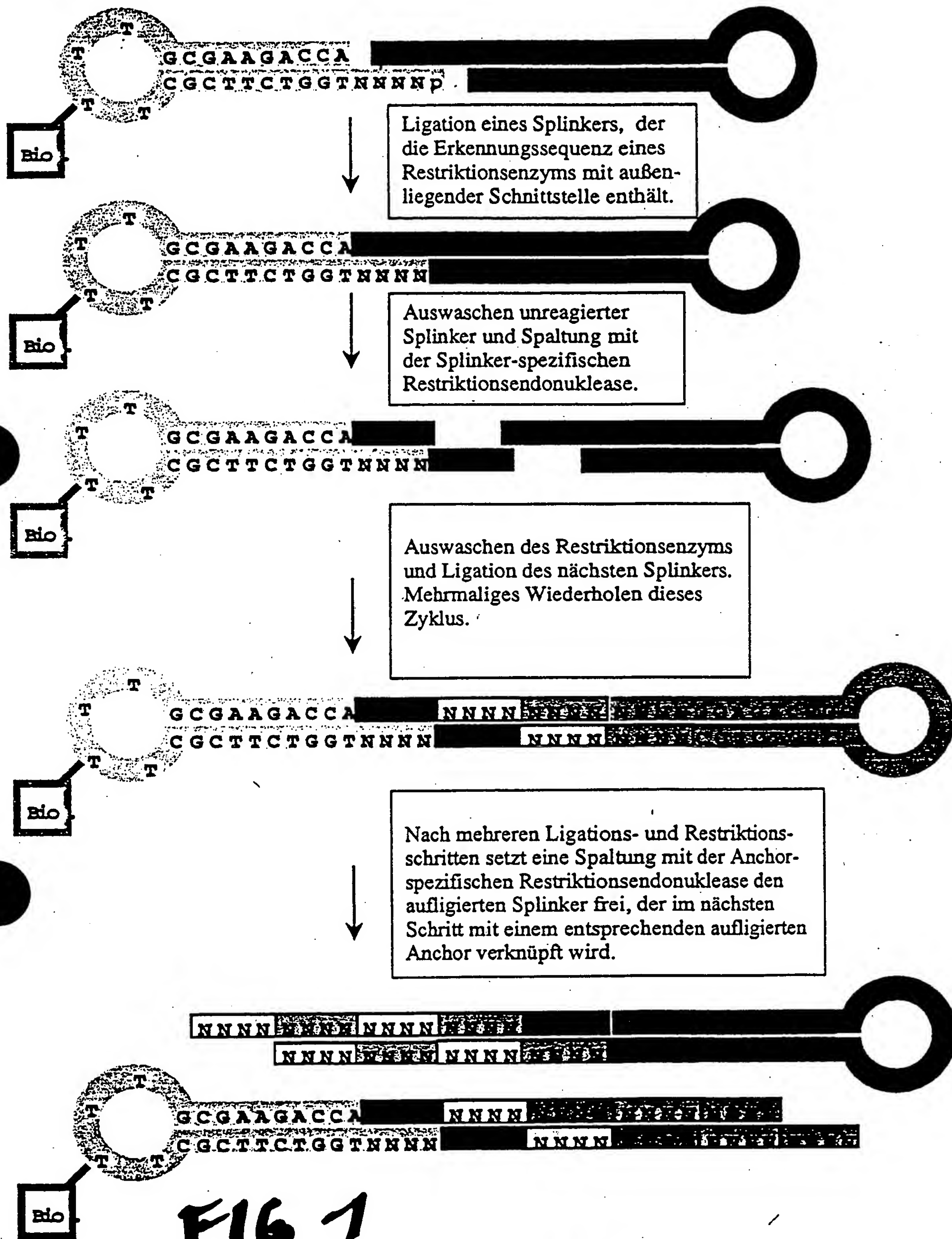


FIG 1

1/7

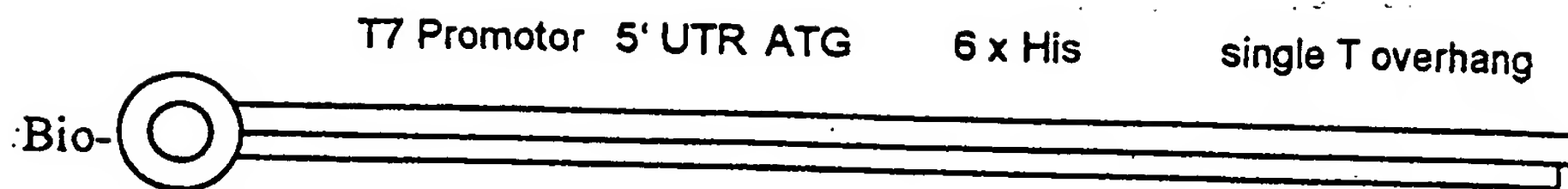
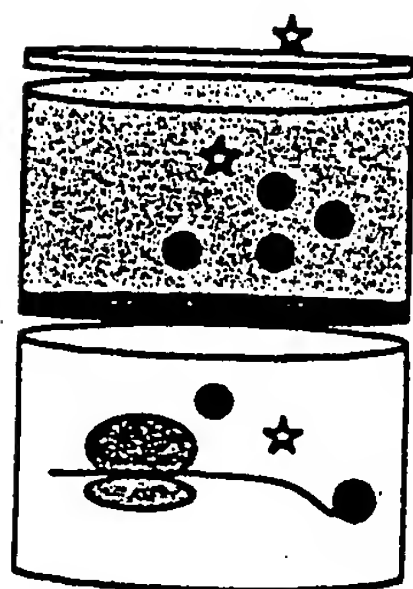


FIG 2



UF Membran MWCO = 12'000
Obere Reaktionskammer: Aufreinigung (Ni-NTA o.ä.)
UF Membran MWCO=200'000
Untere Reaktionskammer: Transkription/Translation
Zufuhr frischer Reaktanden

FIG 3

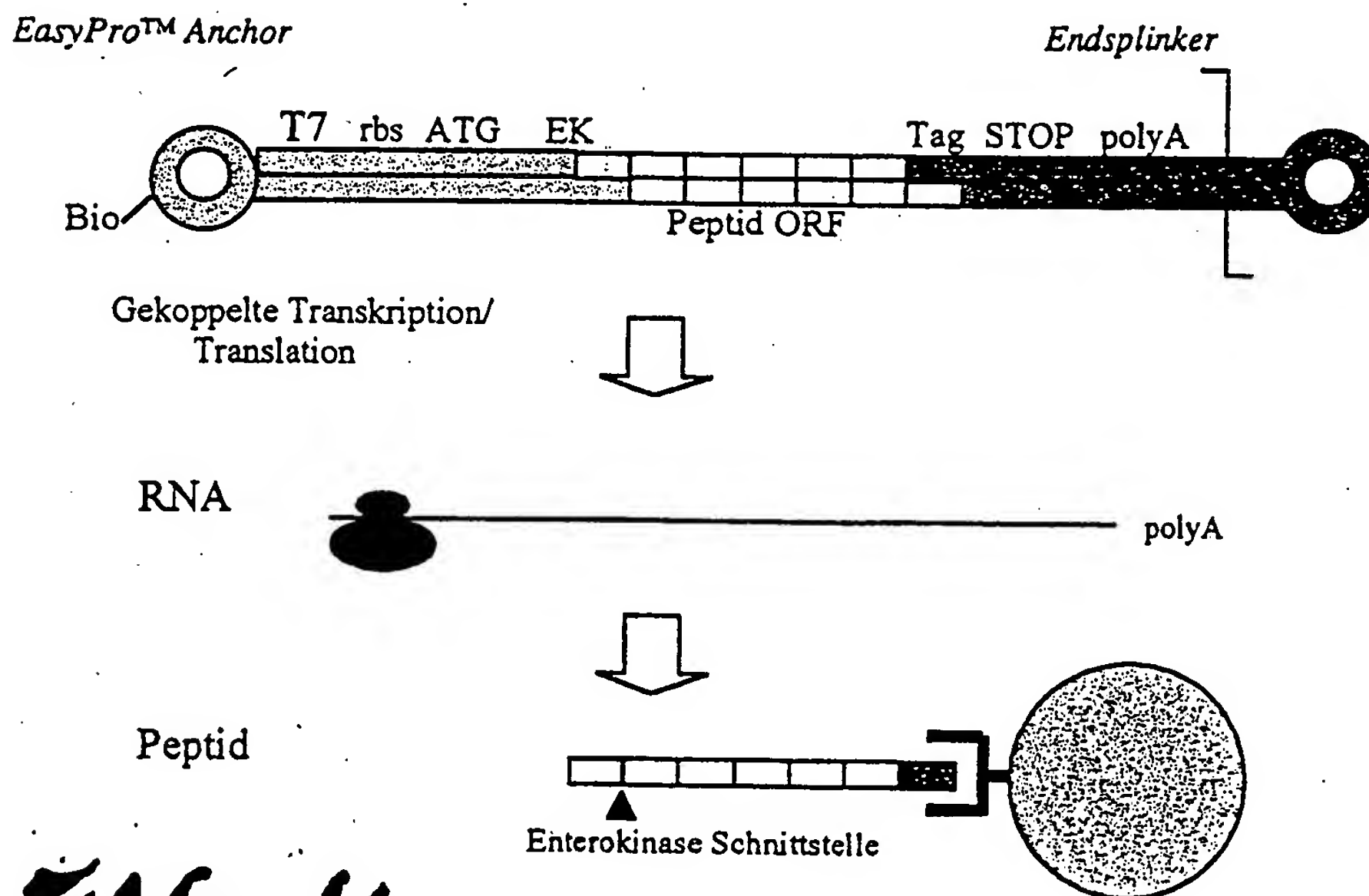


FIG 4

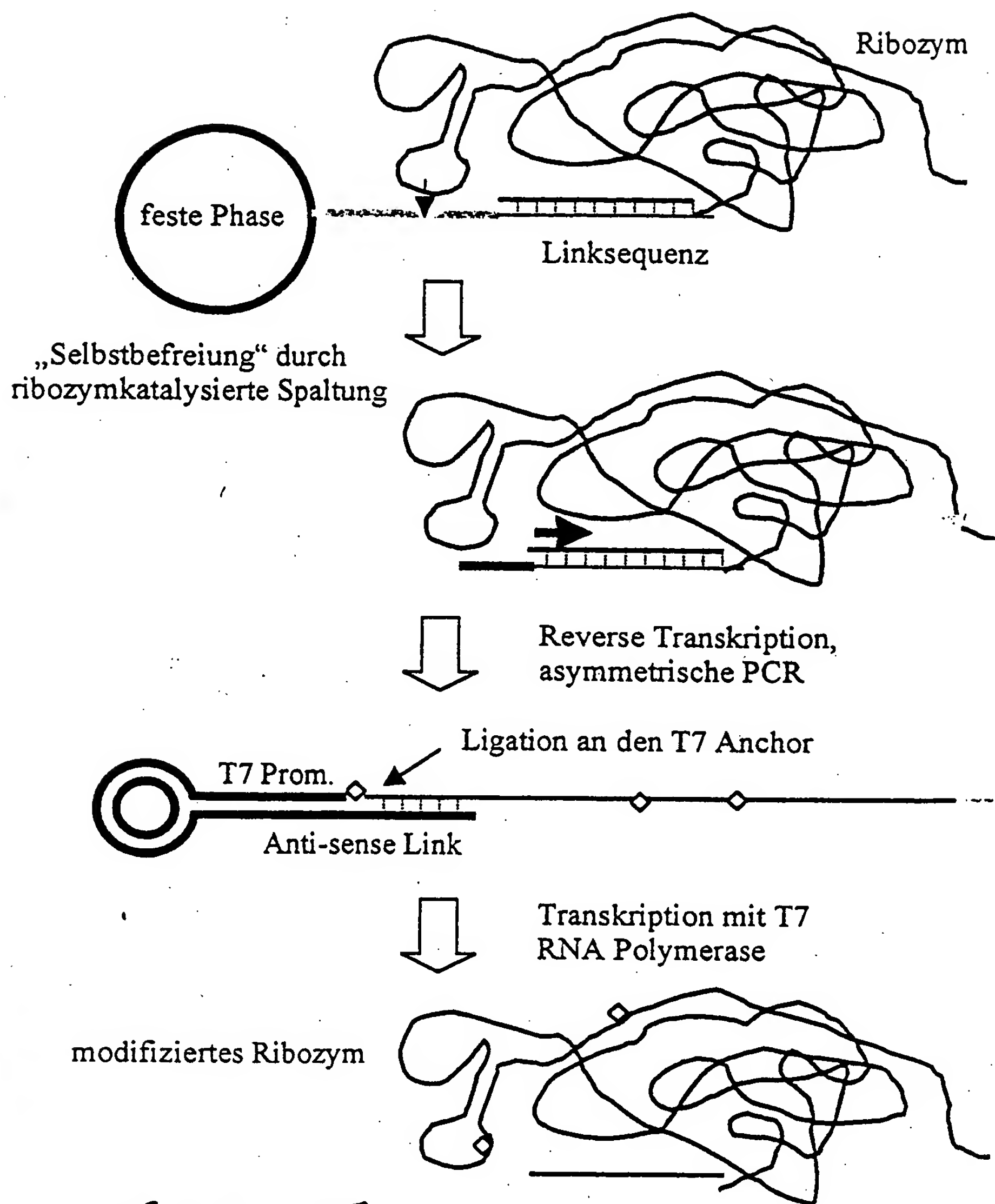


FIG 5

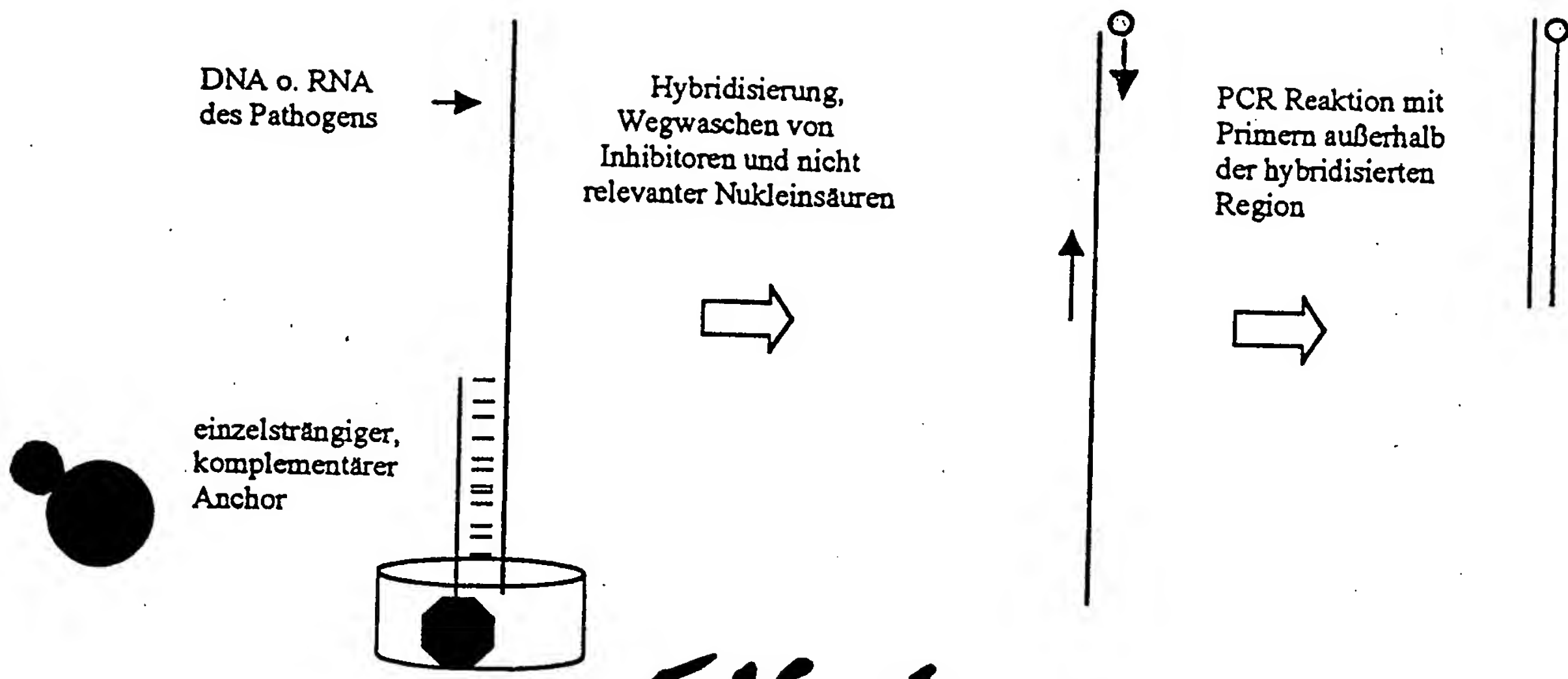


FIG 6

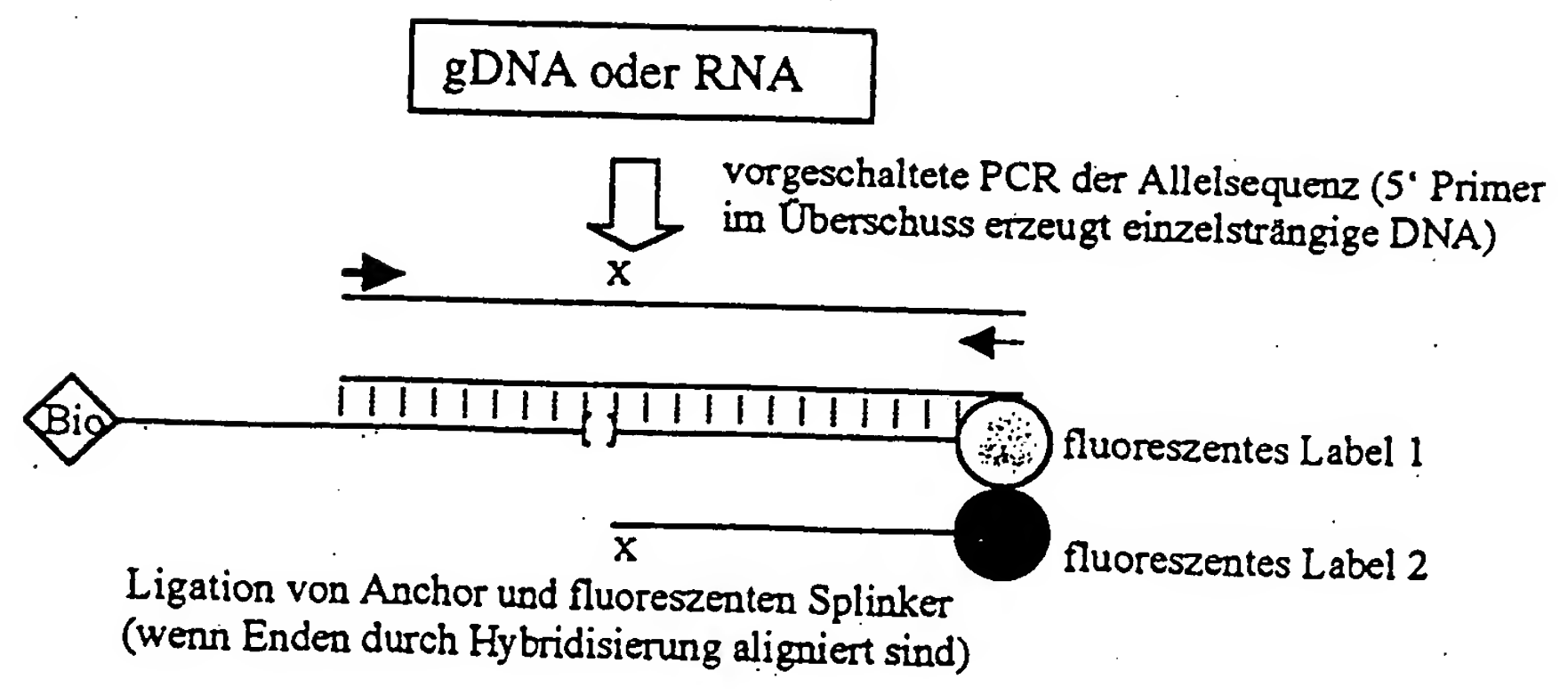


FIG 7

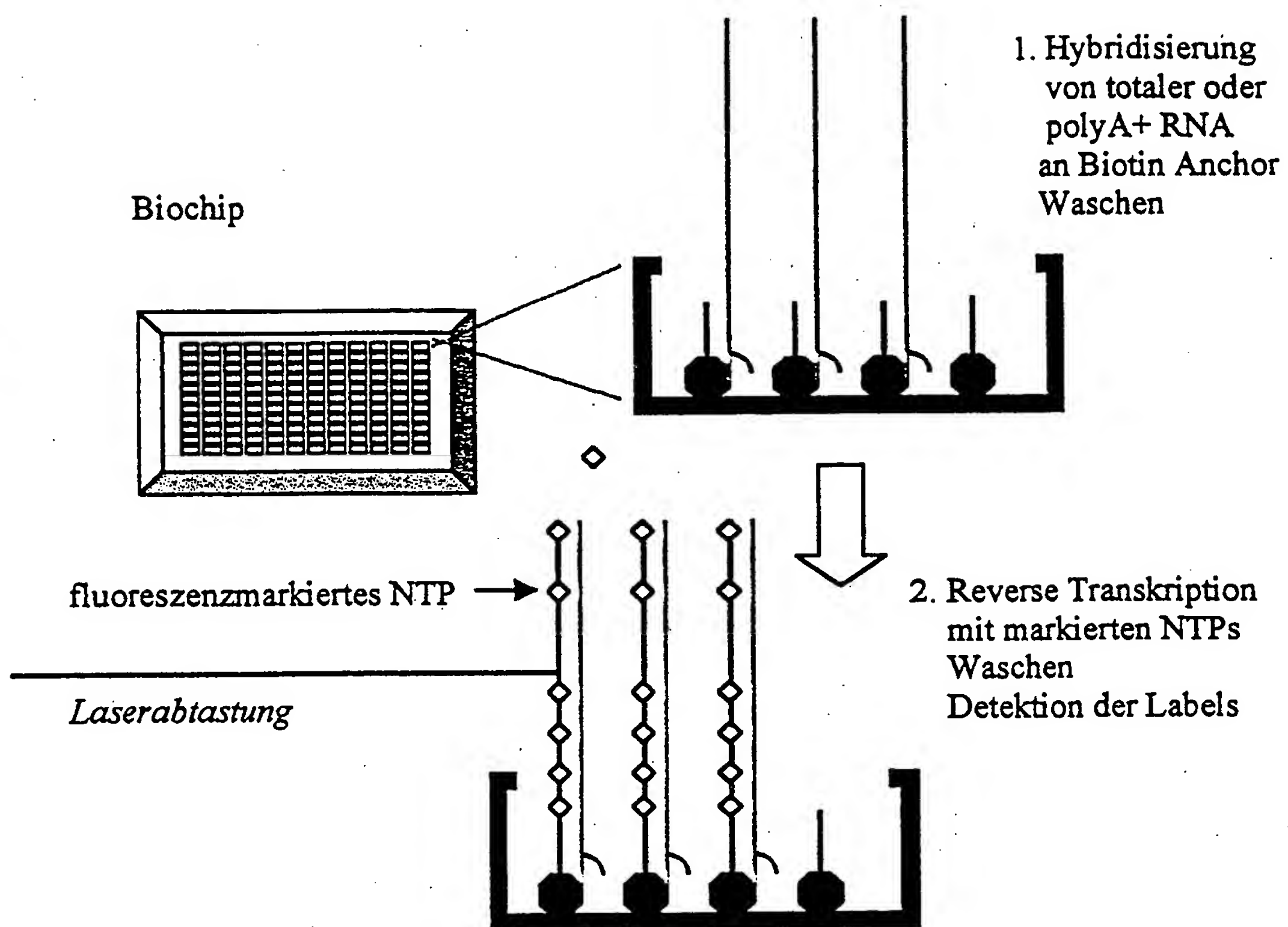
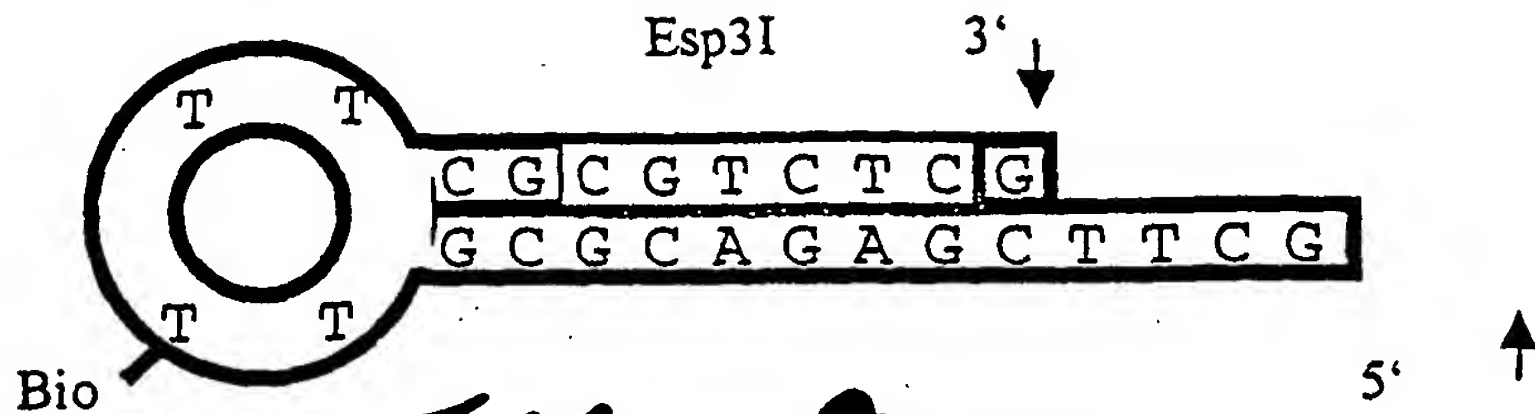
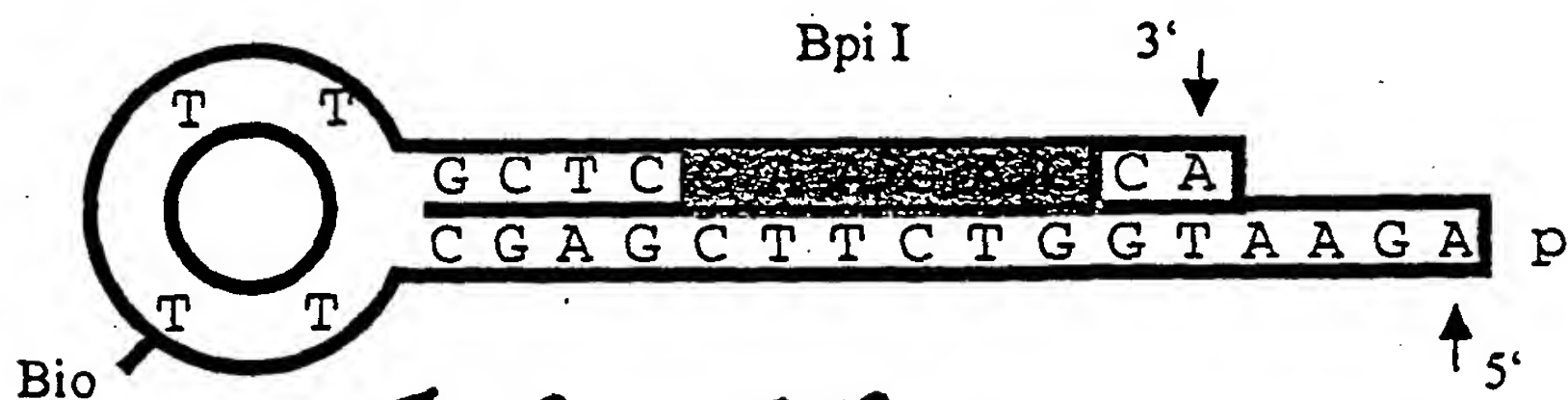


FIG 8

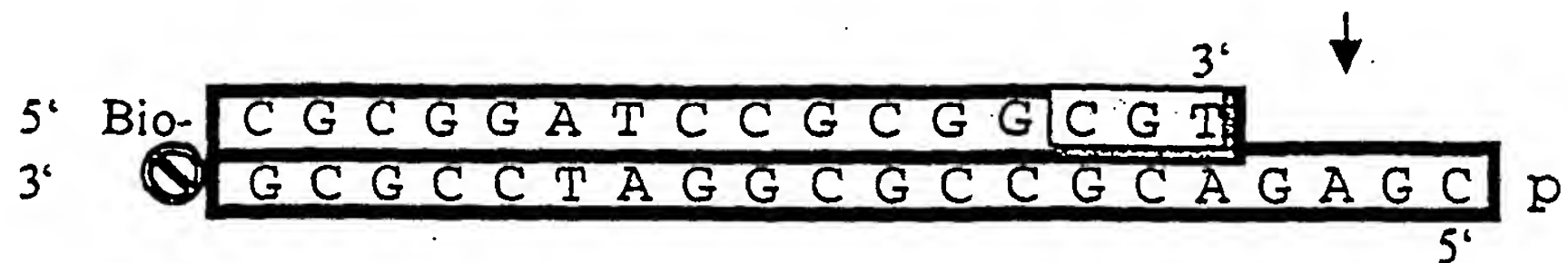
Anchor A3I

**FIG 9**

Anchor A2+

**FIG 10**

Bipartite Anchor (Rekonstitution der Esp3I Schnittstelle erst nach Ligation)

**FIG 11**

Splinker S1H

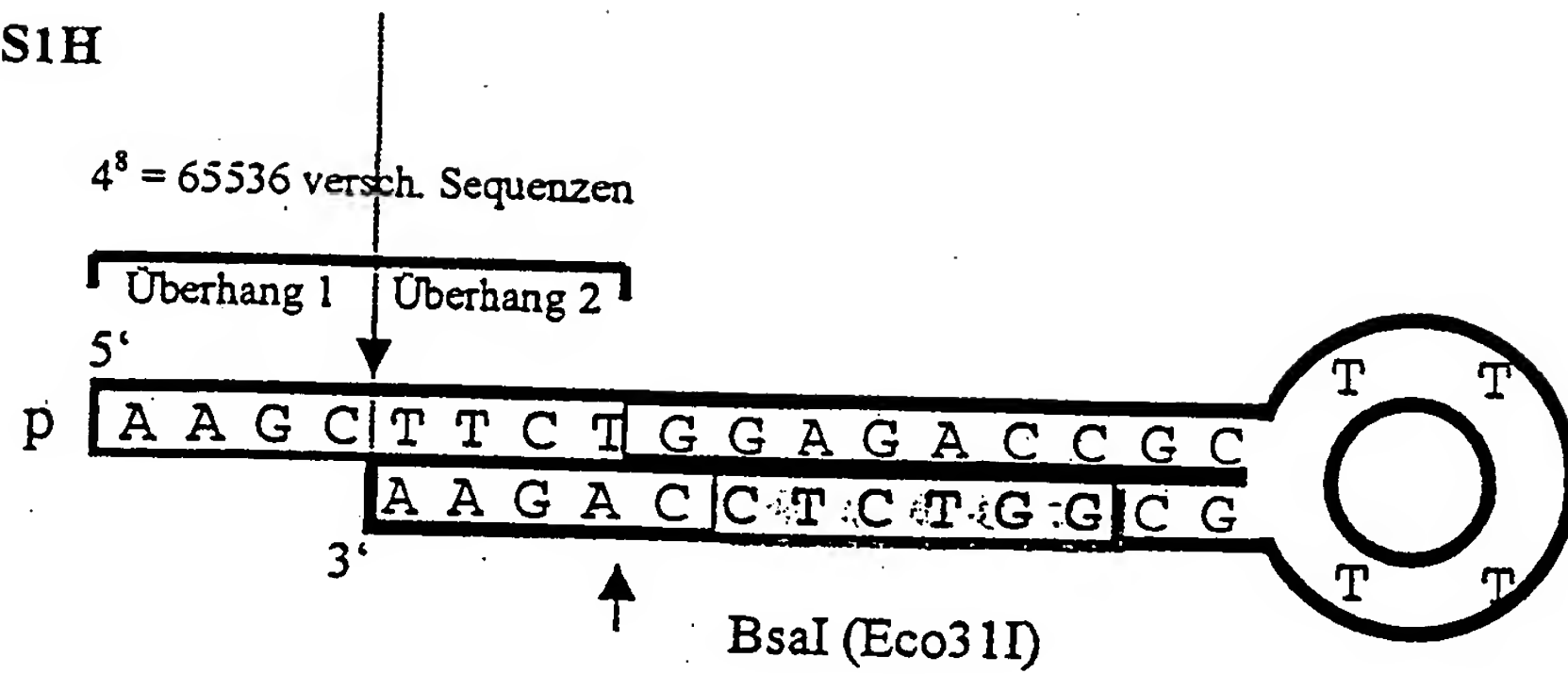


FIG 12

Bipartite Splinker NS1

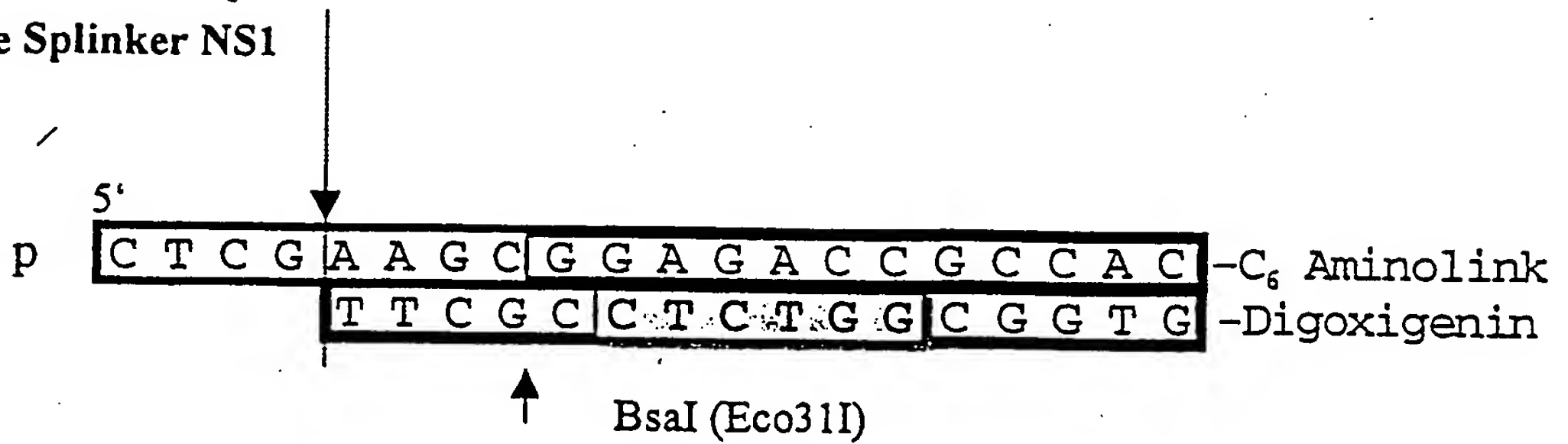


FIG 13